

Aus dem Institut für Mikrobiologie
und Immunologie
der Ruhr-Universität Bochum
(Leiter: Prof. Dr. W. Opferkuch)
und der
Medizinischen Klinik
der Berufsgenossenschaftlichen Kranken-
anstalten Bergmannsheil
- Universitätsklinik - Bochum
(Leiter: Prof. Dr. W. T. Ulmer)

SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER
BEI
CHRONISCHER BRONCHITIS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität zu Bochum

vorgelegt von
Eckard Kottmann
aus Bissendorf (Krs. Osnabrück)
1981

1982

Aus dem Institut für Mikrobiologie
und Immunologie
der Ruhr-Universität Bochum
(Leiter: Prof. Dr. W. Opferkuch)
und der
Medizinischen Klinik
der Berufsgenossenschaftlichen Kranken-
anstalten Bergmannsheil
- Universitätsklinik - Bochum
(Leiter: Prof. Dr. W. T. Ulmer)

SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER
BEI
CHRONISCHER BRONCHITIS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer

Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität zu Bochum

vorgelegt von
Eckard Kottmann
aus Bissendorf (Krs. Osnabrück)

1981



Die, welche eine Tasse aus Holz
mit der Weisheit und der Schönheit
schon seit Jahrhunderten sind
Erbschaften der Menschheit
sind die
die wir uns heute noch zu
denkmalen und die wir
in der Welt haben.

W. Opferkuch
Tag 11. Seite 23 von 35

Dekan: Prof. Dr. med. H. Viefhues

Referent: Prof. Dr. med. W. Opferkuch

Korreferent: Prof. Dr. med. W.T. Ulmer

Tag der mündlichen Prüfung: 25.1.1982

" O, welch eine Tiefe des Reichtums
und der Weisheit und der Erkenntnis
Gottes! Wie unerforschlich sind SEINE
Entscheidungen und unausdenkbar
SEINE Wege!
Denn aus IHM und durch IHN und zu
IHM sind alle Dinge. SEIN ist die Ehre
in Ewigkeit! Amen. "

NT, Römerbrief
(Kap. 11, Verse 33 und 36).

INHALTSVERZEICHNIS

A.	<u>Einleitung</u>	1
B.	<u>Material und Methoden</u>	
B.I.	<u>Material</u>	5
B.I.1.	Patienten	5
B.I.2.	Sputum	5
B.I.3.	Serum	5
B.II.	<u>Methoden</u>	6
B.II.1.	Aufarbeitung des Sputums	6
B.II.1.a)	Vorbereitungen	6
B.II.1.b)	Bestimmung der Keimzahl	6
B.II.1.c)	Anzüchtung der Keime	6
B.II.1.d)	Kriterien für die Differenzierung der Keime	7
B.II.1.e)	Herstellung einer Antikörpersus - pension aus dem Sputumhomogenisat	7
B.II.2.	Verarbeitung des Venenblutes	8
B.II.3.	Bestimmung der IgA-, IgG- und IgM- Konzentrationen mit Laser-Nephelo- metrie	8

B.II.3.a)	Prinzip	8
B.II.3.b)	Durchführung	8
B.II.4.	Indirekter Immunfluoreszenztest	9
B.II.4.a)	Prinzip	9
B.II.4.b)	Praktische Durchführung	9
B.II.4.c)	Auswertung	11
B.II.5.	Solid-Phase-Bindungstest	12
B.II.5.a)	Prinzip	12
B.II.5.b)	Praktische Ausführung	12
B.II.5.c)	Auswertung	14
C.	<u>Ergebnisse</u>	15
C.I.	Patienten	15
C.II.	Bakteriologie	15
C.II.1.	Keimzahl	15
C.II.2.	Keimbestimmung	15
C.III.	Antikörper	19
C.III.1.a)	Sputum	19
C.III.1.b)	Verhältnis Sputumimmunglobuline zu Bakterienspezies	19

C.III.2.a)	Serum	19
C.III.2.b)	Verhältnis Serumimmunglobuline zu Bakterienspezies	23
C.IV.	Immunfluoreszenzuntersuchungen	23
C.IV.1.a)	Immunfluoreszenzen im Sputum	23
C.IV.1.b)	Verhältnis von positiven Immunfluoreszenzen im Sputum zu Bakterienspezies	24
C.IV.1.c)	Verhältnis positiver Immunfluoreszenzen im Sputum zu Immunglobulinkonzentrationen im Sputum	24
C.IV.2.a)	Serum-Immunfluoreszenzen	25
C.IV.2.b)	Verhältnis positiver Immunfluoreszenzen zu Bakterienspezies	25
C.IV.2.c)	Verhältnis positiver Serum-Immunfluoreszenzen zu Immunglobulinkonzentrationen im Sputum	26
C.V.	Solid-Phase-Bindungstest (SPBT)	26
C.V.1.	Verhältnis der SPBT-Titer zu Bakterienspezies	26
C.V.2.	Verhältnis der SPBT-Titer zu Immunglobulinkonzentrationen im Sputum	26
C.V.3.	Verhältnis von SPBT-Titern zu Immunfluoreszenzen	29
C.V.4.	Verhältnis von SPBT-Titern zur Klinik der Patienten	29

D.	<u>Diskussion</u>	30
D.I.	Klinik	30
D.II.	Mikrobiologische Untersuchungen	30
D.II.1.	Materialgewinnung	30
D.II.2.	Keimzahl	31
D.II.3.	Keimbestimmung	32
D.III.	Immunglobulinbestimmung	33
D.IV.	Antikörperbindungen	35
D.IV.1.	Antikörperbindungen an Bakterien- antigenextrakten	35
D.IV.2.	Indirekte Immunfluoreszenz	36
D.IV.3.	Solid-Phase-Bindungstest	39
D.V.	Ausblick	40
E.	<u>Literaturverzeichnis</u>	41

ABKÜRZUNGEN

der im Text gebrauchten Bakteriennamen

H. influenzae	Hämophilus influenzae
H. parainfluenzae	Hämophilus parainfluenzae
D. pneumoniae	Diplococcus pneumoniae
Staph. aureus	Staphylococcus aureus
Staph. epidermidis	Staphylococcus epidermidis
N. catarrhalis	Neisseria catarrhalis
vergr. Strep.	vergrünende Streptokokken

A. EINLEITUNG

Die chronische Bronchitis bzw. das chronisch unspezifische respiratorische Syndrom (CURS) gehört zu den Krankheiten, die durch viele Faktoren bedingt sind.

Eine umfassende Studie aus dem Jahre 1975 (DFG) stellt fest, daß Faktoren wie Lebensalter, Staubexposition am Arbeitsplatz und Rauchen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des CURS erhöhen. Weitere Ursachen sind die endogene Konstitution, Klima, allergische Disposition, Infekte der Atemwege und chemische Noxen.

Ferlinz (1974) betont, daß die manifeste chronische Bronchitis gekennzeichnet ist durch rezidivierend auftretende akute Exazerbationen, die zu vermehrter Schleimproduktion führen und die ohnehin schon geminderte Ventilation noch weiter herabsetzen. Diese Exazerbationen werden durch bakterielle Infektionen ausgelöst.

Da die Infektion den Verlauf der Krankheit derart ungünstig beeinflusst, ist ihre Rolle in der Vergangenheit untersucht worden.

Folgende Vorstellungen wurden dabei bevorzugt bearbeitet:

-Bestimmung der Keime im Sputum

Verschiedene Untersucher beschäftigten sich mit der bakteriellen Flora im Respirationstrakt (Holdaway & Turk, 1974; May, 1975; Smith et al., 1972; Schreiner et al. 1978 ; Ellis et al., 1978) verweisen neben ihren Untersuchungen auf dem bakteriellen Gebiet auch auf virale Infekte. Diese Arbeiten stellen die besondere Bedeutung von Bakterien-spezies wie *H. influenzae* und *D. pneumoniae* in der akuten Exazerbation der chronischen Bronchitis fest.

May (1975) deutet an, daß apathogenen Bakterien-spezies eine Bedeutung zukommen könne. Nicholls (1975) wiederum führt das Auftreten von Spezies wie *Staph. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Proteus* auf die Behandlung mit Antibiotika zurück.

- Bestimmung von Immunglobulinkonzentrationen

Eine zweite Fragestellung betrifft die Bedeutung von Immunglobulinkonzentrationen im Serum und im Sputum chronischer Bronchitiker.

Rasche und Ulmer (1971) bestimmten die Immunglobulinkonzentrationen bei chronisch obstruktiver Bronchitis. Sie fanden im Sputum ein Überwiegen der IgA-Fraktion verglichen mit der IgG-Fraktion. Im Serum fanden sie IgA- und IgG-Konzentrationen, die an der oberen Grenze des Normalbereiches lagen. Sie konnten keinen Zusammenhang von IgA-Konzentrationen im Sputum mit typischen Krankheitsbildern herstellen.

Rasche berichtet (1976) über einen Fall mit IgA-Mangel im Serum sowie im Sputum. Der Patient - ein 14jähriges Kind - litt unter chronisch obstruktiven Atemwegsbeschwerden.

Lim et al. (1978) und Baker (1976) weisen beide ebenfalls auf rezidivierende Atemwegsinfekte bei Kindern mit einem IgA-Mangel hin. Diese Autoren ordnen aber die Atemwegsbeschwerden dem Asthma zu.

- Immunisierungsversuche

In einer weiteren Richtung wurde die Immunisierung von Patienten mit chronischer Bronchitis gegen Antigene viralen und bakteriellen Ursprungs behandelt.

Rasche und Ulmer (1973) immunisierten Patienten mit einem Aerosol, das 19, häufig bei chronischer Bronchitis auftretende bakterielle Antigenextrakte enthielt. Die IgA-Konzentration im Sputum stieg nach mehrmaliger Applikation an. Klinisch zeigte sich eine leichte Verbesserung der Resistance, die aber auf einen unspezifischen Effekt zurückgeführt wurde. Letztlich konnten keine Aussagen über die therapeutische Wirksamkeit des Aerosols gemacht werden.

Shore et al. (1973) verfolgten die Antikörpertiter bei Patienten, die auf verschiedenen Wegen mit inaktivierter Influenza-Vakzine behandelt worden waren. Sie stellen fest, daß eine

einmalige subcutane Gabe die größten Anstiege der IgA-Konzentration bewirkt.

In der Folge wiederholten Gross et al. (1976) diese Immunisierungen mit Influenza-Vakzine in modifizierter Form.

Sie arbeiteten heraus, daß die Änderung der Antikörpertiter von der Höhe des zuvor bestandenen Titers abhängt.

Außerdem zeigten sie, daß es keinen Zusammenhang zwischen der Immunglobulinkonzentration im Sputum und der Titerhöhe gibt.

Korol (1978) immunisierte Patienten mit einem Staphylokokkenantigen. Er gibt als Resultat eine zufriedenstellende Änderung von klinischen und immunologischen Daten dieser Patienten an.

-Antikörpernachweis

Einige Untersucher beobachteten mit verschiedenen Methoden Bindungen von Bakterienantigenen mit Antikörpern aus Sputum und Serum.

Burns und May (1967) bzw. Burns (1968 a,b; 1972) führten eine Versuchsserie durch, um spezifische Antikörper gegen Hämophilus-, Pneumokokken- und Klebsiellenantigenextrakten mittels Agargel-Doppeldiffusion im Serum festzustellen. Sie registrierten spezifische Präzipitate in verschiedenem Umfange aus den Patientenseren.

Einige Jahre später wurden diese Versuche von J.L. Davies et al. (1974) wiederholt. Dieses Mal wurde ein Hämophilusantigenextrakt verwendet, daß spezifischer als der sonst eingesetzte Extrakt war. Es wurde festgestellt, daß die alten Ergebnisse zum Teil falsch positiv ausgefallen waren.

Nachdem die Reaktionen von Antigenextrakten mit Serumantikörpern lange Zeit allein ausgeführt worden waren, schloß sich die Austestung mit aus Sputum extrahierten Antikörpern an. Clarke (1975/76) kommt zu dem Ergebnis, daß die durch

Serumantikörper erzeugten Reaktionen nicht mit denen durch Sputumantikörper erhaltenen übereinstimmen. Er deutet an, daß die Antigen-Antikörperreaktion an eine allergische Komponente denken läßt.

Zwischenzeitlich hatten sich zwei Arbeitsgruppen mit dem Nachweis spezifischer Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenztechnik beschäftigt. Reichek et al. (1970) isolierten aus Sputen für pathogen gehaltene Bakterien und ließen sie mit den übrigen Seren reagieren. Vor allem wurden Titeranstiege von IgG und IgM gegen *H. influenzae* beobachtet.

Gump et al. (1973) wiesen bei späteren Untersuchungen ebenfalls bindende Antikörper gegen einen *Hämophilus*stamm nach, der von einem Patienten aus der Versuchsserie stammte. Sie finden im Sputum sowie im Serum Antikörperbindungen. Jedoch konnten sie nur einmal einen vierfachen Titeranstieg im Serum während der Verlaufsuntersuchungen feststellen.

Auf dem Hintergrund der vorliegenden Arbeiten wird das hier behandelte Thema in folgenden Richtungen fortgeführt:

In den ersten Tagen der akuten Exazerbation einer chronischen Bronchitis werden Sputumproben bei nicht vorbehandelten Patienten abgenommen. Aus der gewonnenen Sputumprobe werden im Gegensatz zu anderen bisher vorliegenden Arbeiten alle aktuell vorhandenen Keime und nicht nur gewisse Spezies angezüchtet. Die für die Antikörperbestimmungen und Antikörperbindungen erforderliche Lösung stammt aus derselben Probe. Besonders die spezifische Antikörperbindung von Antikörpern der Klasse IgA im Sputum gegen die unzerstörten Bakterien desselben Patienten werden für jede angezüchtete Spezies bestimmt. Zu Vergleichszwecken erfolgen entsprechende Bindungstests mit Serumantikörpern in den Klassen IgA, IgG und IgM. Auf diese Weise soll ein umfassender Überblick über die aktuelle und lokale sekretorische Immunantwort gegen das zugehörige aktuelle Keimspektrum gegeben werden.

B MATERIAL und METHODEN

I. MATERIAL

1. Patienten

Die Patienten befanden sich zur stationären Behandlung in der Klinik. Sie hatten größtenteils die klinische Diagnose einer obstruktiven Emphysebronchitis und produzierten Sputum. Eine Woche lang hatten sie zuvor keine Antibiotika bekommen. Die letzten 20 der insgesamt 46 Patienten befanden sich erst ein bis zwei Tage in der Klinik. Sie waren von ihrem Hausarzt und von der Klinik aus noch nicht antibiotisch vorbehandelt. Diese Patienten waren wegen einer akuten Exazerbation ihrer chronischen Bronchitis eingeliefert worden. Ungefähr ein Viertel der Patienten hatte neben der chronischen Bronchitis eine Silikose.

Das Alter der Patienten lag in einem Bereich von 52 bis 78 Jahren, mit einem Median bei 68 Jahren. Alle Patienten waren männlichen Geschlechts.

2. Sputum

Das zur Keimbestimmung und Herstellung einer Antikörpersuspension verwendete Material bestand aus Sputum von den oben genannten Patienten.

Die Patienten wurden angewiesen, morgens zwischen 6 und 8 Uhr ihren Auswurf in einem Warmhaltegefäß zu sammeln.

Nach dieser Zeit wurde die Sputumprobe in einem Warmhaltebehälter zur Weiterverarbeitung in das Labor gebracht.

3. Serum

Den Patienten wurde an demselben Morgen durch Venenpunktion 5 ml Blut abgenommen.

II METHODEN

1. Aufarbeitung des Sputums

1.a) Vorbereitungen

Im Labor wurde das Sputum unter sterilen Bedingungen auf ein Sieb gegeben und mit 0,9 % NaCl gewaschen .

Nachdem durch dieses Waschen die Beimengungen von Saliva entfernt worden waren, wurde das visköse, aus den Bronchien stammende Sputum gewogen. Das Gewicht lag zwischen 1 - 5 g. Dann wurde jede Sputumprobe mit 0,9 % NaCl auf 10 g aufgefüllt und in einen Homogenisator (Stomacher) gegeben, ein Gerät, das durch einen sich mehrere hundertmal in der Minute wiederholenden Stoßvorgang visköse Massen homogenisiert. Alle Sputumproben wurden 30 sec. in diesem Gerät behandelt.

1.b) Bestimmung der Keimzahl

Aus dem Sputumhomogenisat wurde mit einer kalibrierten Öse 0,001 ml entnommen und in 1 ml 0,9 % NaCl verrieben.

Von diesem 1 ml wurden 0,01 ml auf einer Blutplatte ausgespatelt.

Nach 18 bis 24 Stunden Bebrütung wurde die Anzahl der Kolonien gezählt und mit den Verdünnungsfaktoren multipliziert. Schließlich wurde die Keimzahl auf 1 ml ursprünglich vorhandenen Sputums bezogen.

1.c) Anzüchtung der Keime

Aus dem Sputumhomogenisat wurde jeweils eine Öse Material entnommen und auf folgende Platten ausgestrichen:

1 MacConkey-Platte

1 Blut -Platte

1 Kochblut -Platte

Außerdem wurde 1 Soya -Bouillon und

1 Fildes -Bouillon (zur Anreicherung von

hämophilen Keimen) mit Material beimpft.

Nach 24 Stunden wurde die Fildes-Bouillon auf einer Kochblut-Platte ausgestrichen.

Alle Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Luft 24 h bebrütet. Danach erfolgte die Differenzierung der Keime.

1.d) Kriterien für die Differenzierung der Keime

Alle gewachsenen Keimspezies wurden in Reinkulturen angezüchtet. Von Anfang an wurde bei der Suche nach gewachsenen Keimen besonders auf das Wachstum von *H. influenzae* bzw. Spezies und Pneumokokken geachtet.

Folgende kulturelle und biochemische Merkmale führten zur Unterscheidung der einzelnen Spezies:

<i>H. influenzae</i>	: Plättchen Test auf X- und V-Faktor
<i>H. parainfluenzae</i>	: s.o., nur V-Faktor positiv
<i>D. pneumoniae</i>	: kulturelle Merkmale, Präparat, Optochinplättchen
<i>Staph. aureus</i>	: Hämolyse auf Blut, Clotting-Factor auf dem Objektträger
Gramnegative Stäbchen	: Api 20 bunte Reihen, z.T. mit Zusatzuntersuchungen
Vergr. Streptokokken	: kulturelle Merkmale, Präparat
<i>Staph. epidermidis</i>	: kulturelle Merkmale, zur Abgrenzung gegen Streptokokken, Test auf Katalase
<i>N. Catarrhalis</i>	: kulturelle Merkmale, Präparat
Coryneforme Stäbchen	: kulturelle Merkmale, Präparat

1.e) Herstellung einer Antikörpersuspension aus dem Sputumhomogenisat

Das Sputumhomogenisat wurde bei 19000 Upm, mindestens 15.000 g und 10 °C 30 min. lang zentrifugiert. Dadurch wurde das vorliegende Sputumhomogenisat in eine Gel- und eine Solphase getrennt. Die Gelphase enthält dabei die viskösen Sputumbestandteile, während die Solphase vor allem aus der 0,9 % NaCl, einem Großteil der im Sputum befindlichen Antikörper sowie anderen Molekülen mit relativ geringeren Gewichten besteht.

Der wäßrige Überstand - die Solphase - wurde in kleinen Portionen abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

2. Verarbeitung des Venenblutes

Das Venenblut wurde für 15 min. bei 4000 Upm zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde in kleinen Portionen abpipettiert und bei -20° C eingefroren.

3. Bestimmung der IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationen mit Lasernephelometrie

3.a) Prinzip

Zu einer im Reagenzglas vorgelegten Antikörperlösung (z.B. Goat-Ig-anti-Human-IgA) wird ein Serum verdünnt mit dem zu bestimmenden Antigen gegeben (z.B. Serum- IgA als Antigen). Während einer vorgegebenen Inkubationszeit reagieren Antigen und Antikörper miteinander. Dann wird das Reagenzglas mit den entstandenen Immunkomplexen in den Strahlengang des Nephelometers gestellt. Ein Laserstrahl wird an den Antigen-Antikörperkomplexen gestreut und in einem bestimmten Winkel zum ursprünglich eintreffenden Strahl von einem Photoelement quantitativ gemessen.

Durch Verwendung eines Lasers, dessen Licht qualitativ aufgrund seiner Kohärenz und Bündelung anderen Lichtquellen überlegen ist, und durch Messen des aufgefangenen Lichtes in einem ausgewählten Winkel besteht in einem weiten Meßbereich eine Proportionalität zwischen der aufgefangenen Lichtstärke und der Konzentration des gesuchten Antigens. Da in allen Versuchsansätzen eines Tests dieselbe Antikörperlösung vorgelegt wird, erhält man durch den Vergleich der Meßwerte der fraglichen Antigenkonzentration mit denen standardisierter Antigenproben die absolute, fragliche Antigenkonzentration.

3.b) Durchführung

Der Test wurde mit einem Hyland-Nephelometer und den dazu käuflichen Reagenzien durchgeführt.

Die zu bestimmenden Seren wurden in den von der Firma vorgeschlagenen Verdünnungen eingesetzt.

Zur Bestimmung der Immunglobuline im Sputum war es notwendig, zehnfach größere Volumina der Suspension einzusetzen. Hier wurden die erhaltenen Immunglobulinkonzentrationen mittels Korrekturfaktoren auf ein Gramm unverarbeiteten Sputums bezogen.

4. Indirekter Immunfluoreszenztest

4.a) Prinzip

Ein mit Plastik beschichteter Objektträger enthält ca. acht kleine Aussparungen (Näpfe), auf deren Fläche das darunterliegende Glas freiliegt. Auf der Glasoberfläche dieser Aussparungen werden Bakterien als Antigen adsorbiert.

In einem 2. Arbeitsgang wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, die den zu untersuchenden 1. Antikörper beinhaltet. Von jeder Verdünnungsstufe wird eine gleichbleibende Menge auf eine Antigenstelle des Objektträgers aufgetragen und inkubiert. Danach wird der nicht gebundene 1. Antikörper abgewaschen. Der 3. Arbeitsgang besteht darin, daß ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper, gegen den 1. Antikörper als Antigen, auf die Antigenstellen aufgetragen wird. Dies ist der 2. Antikörper. Nach Inkubation wird der nicht gebundene Antikörper abgewaschen.

4.b) Praktische Durchführung

-Vorbereitung der Objektträger

Zunächst wurde eine größere Menge Objektträger über Nacht in einem Küvettenbad, mit 1 Teil Aceton : 1 Teil Äthylalkohol gemischt, entfettet.

Danach wurden die Objektträger getrocknet und mit einer Pipette acht Tropfen Glycerin in gleichen Abständen aufgetragen.

Diese Tropfen befanden sich an den zukünftigen Antigenstellen.

Nun wurden alle Objektträger mit einem Teflonspray besprüht. Nach Spülen unter fließendem Wasser war das Glycerin entfernt, und die Aussparungen waren hergestellt.

- Auftragen der Antigenlösung

Als Antigen dienten bei diesen Untersuchungen, die aus dem Patientensputum angezüchteten Bakterien.

Von einer Reinkultur wurde so viel in einer 0,9 % NaCl-Lösung verrieben, daß aufgrund der Trübung mit einer Konzentration von 10^6 - 10^8 Keimen pro ml zu rechnen war.

Von dieser Bakteriensuspension wurde auf jede Antigenstelle ein Tropfen mit 10 Mikroliter Volumen gegeben.

Die Fixation erfolgte durch Eintauchen in eine 10 %ige Methylalkohol-Lösung.

- Auftragen des 1. Antikörpers

Vom Serum bzw. von der Sputumsuspension des betreffenden Patienten wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Sie umfaßte die Verdünnungsstufen 1:1, 1:5, 1:10 bis 1:320.

Die Verdünnungen wurden mit einem NaCl-Puffer hergestellt, der später auch zum Waschen der Präparate eingesetzt wurde.

10 Mikroliter einer Verdünnungsstufe wurden auf eine Antigenstelle pipettiert. Auf eine Antigenstelle wurde nur

Puffer gegeben. Diese Stelle diente bei der Auswertung als

Negativkontrolle. Der Objektträger wurde dann während 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert (bei 37° C).

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Objektträger mit NaCl-Puffer gewaschen, in Aqua dest. gespült und dann getrocknet.

- Auftragen des 2. Antikörpers

Als zweiter Antikörper wurden FITC markierte Fluoreszenseren verwendet. Für die Immunfluoreszenzen der ersten

36 Patienten standen Seren der Fa. Behring zur Verfügung mit folgenden Daten :

Kaninchen-Ig-anti-Mensch-IgM/ μ -Kette Mol. F/P 2,1

Kaninchen-Ig-anti-Mensch-IgG/ γ -Kette Mol. F/P 2,5

Kaninchen-Ig-anti-Mensch-IgA/ α -Kette Mol. F/P 2,0

Für die Immunfluoreszenzen der letzten Patienten wurde ein Serum der Fa. Nordic benutzt:

Goat-Ig-anti-Human-IgG

Goat-Ig-anti-Human-IgM

Goat-Ig-anti-Human-IgA

Die Seren beider Firmen wurden in einer Verdünnung von 1:50 auf die Antigenstellen der Objektträger aufgetragen. Dann erfolgte wie beim ersten Antikörper eine Inkubationszeit von 30 Minuten und das Waschen.

4.c) Auswertung

Die Auswertung erfolgte unter einem Leitz Fluoreszenzmikroskop mit einem 50x Objektiv in Wasserimmersion.

Die Beurteilung der Fluoreszenzstärke erfolgte innerhalb einer Skala, die von einfach bis vierfach positiv reichte. Dabei wurde eine Fluoreszenz, die als doppelt positiv bezeichnet wurde, als ein sicher positives Zeichen für eine spezifische Antigen-Antikörper Bindung angesehen. Um unspezifische Fluoreszenzen auszuschließen, wurde mit einer negativen Kontrolle verglichen.

5. Solid-Phase-Bindungstest

5.a) Prinzip

Der Solid-Phase-Bindungstest (SPBT) bzw. der Solid-Phase-Radioimmunoassay (sogenannt, wenn eine standardisierte Bezugskurve vorliegt) ist eine empfindliche Methode zum Nachweis spezifischer Antigen-Antikörperbindungen.

In Tests dieser Art sind die Antigene auf einer festen Oberfläche gebunden. Im vorliegenden Fall bot es sich an, die mit Zellwandantigenen ausgestatteten Bakterien als Partikel für die "Solid-Phase" zu nehmen.

Prinzipiell werden wie beim indirekten Immunfluoreszenztest zu den in Lösung befindlichen Partikeln ein erster und ein zweiter Antikörper hinzugefügt, geeignete Wasch- und Inkubationsvorgänge vorausgesetzt. Der zweite Antikörper ist statt mit einem Fluoreszenzfarbstoff mit einem radioaktiven Marker versehen und ermöglicht die Auswertung des Ansatzes durch einen Gamma-Counter.

Wenn eine Verdünnungsreihe des ersten Antikörpers angelegt wird, kann eine Bindungskurve aus den Meßwerten der einzelnen Stufen bestimmt werden.

5.b) Praktische Ausführung

- Herstellung einer Bakteriensuspension für die "Solid-Phase"

Kolonien einer Reinkultur wurden in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung verrieben. Durch Vergleich der Trübung mit der von Suspensionen bekannter Keimzahl wurde eine Keimzahl von $10^6 - 10^7$ pro ml erreicht. Die Suspension wurde unter ständigem Rühren in die bereit gestellten Reagenzgläser für die Verdünnungsreihen abpipettiert (in 50 Mikroliter Portionen).

Die Keimzahl der Suspension wurde bestimmt, indem eine verdünnte Menge auf einer Platte ausgespatelt wurde. Nach 24 Stunden Bebrütung erfolgte das Auszählen der Kolonienzahl und die Berechnung der Keimzahl.

- Verdünnungsreihen des 1. Antikörpers

Von einem Serum oder einer Sputumsuspension wurden Verdünnungsreihen mit einem Waschpuffer hergestellt (Zusammensetzung siehe weiter unten).

Folgende Verdünnungsstufen wurden angefertigt: 1:1, 1:5, 1:10 bis 1:2560 und eine Stufe für eine Negativkontrolle, die allein aus Waschpuffer bestand.

50 Mikroliter einer Verdünnungsstufe wurden in ein Glas mit vorgelegter Bakteriensuspension gegeben.

Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden bei Laboratoriumstemperatur und 18 Stunden bei 4° C.

Nachfolgend wurden die nicht gebundenen Antikörper durch mehrmaliges Waschen (wie bei anderen Radioimmunoassays) entfernt:

Als erstes wurden 200 Mikroliter Waschpuffer zu jedem Glas hinzugefügt. Dann wurde der Ansatz mit 2000 Upm 5 min. lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit Waschpuffer wieder aufgefüllt.

Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem dritten Mal wurde kein Puffer hinzugefügt.

Zusammensetzung des Waschpuffers: (nach Reichlin) :

8,02 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,0225 M

18,0 g NaCl 0,15 M

0,2 g Na azid 0,0015 M

3,8 g EDTA=Titriplex III 0,01 M

ad 2000 ml mit 0,1 N NaOH auf pH 7,4

zusätzlich 4,0 g BSA (Bovines Serumalbumin)

- Der 2. radioaktiv markierte Antikörper, Aufbereitung und Anwendung

Von der Fa. Behring wurde ein Kaninchen - anti-Mensch-IgA mit einer Proteinkonzentration von 0,6 % geliefert.

Dieses Serum wurde von uns wie folgt gereinigt: Das Serum wurde auf eine mit Human-IgG beladene Sephadex G-25 Säule aufgetragen.

Der Durchlauf wurde aufgefangen. Mit Photometrie bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration der aufgefangenen Lösung bestimmt. Sie betrug 0,6 mg/ml.

Diese Lösung sollte Anti-IgA ohne Anti-IgG oder kreuz-reagierende Leichtketten enthalten.

Dieses Anti-IgA-Serum wurde nach der Chloramin-T-Methode radioaktiv mit J^{125} markiert. Die spezifische Aktivität betrug bei Markierung 33×10^3 cpm/ng.

Dieses Serum wurde in einer Verdünnung von 1:50 in jeweils 50 Mikroliter-Portionen zu den Ansätzen gegeben, die dann 24 Stunden bei Labortemperatur inkubiert wurden.

Am folgenden Tag wurde der markierte Antikörper, der keine Bindung mit dem ersten Antikörper eingegangen war, durch den schon oben erwähnten Waschvorgang entfernt.

5,c) Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Ketten-Counter der Fa. Berthold bzw. einem Kassetten-Counter der Fa. Contron. Die Meßzeiten betrugen 0,1 oder 0,2 millimin.. Die Zählung wurde auf eine Minute bezogen als cpm. (counts per minute) protokolliert.

Die Ergebnisse wurden unter Benutzung der Formel

$$Y = \frac{x - NSB}{MB - NSB} \times 100 \%$$

in ein Diagramm eingetragen.

x= Meßwert einer Titerstufe

y= %-Bindung

NSB = negative Kontrolle

MB= Wert mit max. Bindung einer Verdünnungsreihe

Durch Verbinden der erhaltenen Punkte für eine Verdünnungsreihe in ein halblogarithmisches Diagramm (Abzisse: reziproke Verdünnungswerte logarithmisch aufgetragen, Ordinate: linear %-Bindung aufgetragen) wurde die entsprechende Bindungskurve eingezeichnet.

C ERGEBNISSE

I Patienten

Die Sputumproben teilen sich in drei Kollektive auf. Das erste Kollektiv reicht von Nr. 1 - 24. Von diesen Proben wurden alle im Sputum vorhandenen Keime angezüchtet und gegen die Sputumantikörper der Klasse IgA ausgetestet. Außerdem wurden die Gesamtimmungglobuline der Klassen IgA und IgG im Sputum bestimmt. Die Ergebnisse der spezifischen Antikörperbindungen im indirekten Immunfluoreszenztest sind in diesem Kollektiv wegen Unsicherheit in der Auswertung nicht verwendet worden.

Das zweite Kollektiv umfaßt die Nr. 25 - 36. Hier wurden zusätzlich zu den Untersuchungen des ersten Kollektivs die IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationen im Serum bestimmt.

Weiterhin wurde zu Vergleichszwecken die Serumantikörperbindung an die aus Sputum angezüchteten Bakterien bestimmt.

Im dritten Kollektiv von Nr. 37 - 46 wurden dieselben Schritte wie im zweiten wiederholt. Zusätzlich wurde der schon erwähnte SPBT eingesetzt. Vergleichend wurden die klinischen Daten dieser Patienten studiert (Tabelle I):

II Bakteriologie

1. Keimzahl

In allen Sputumproben wurde die Keimzahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. I aufgeführt. Eine besondere Häufung oder Verteilung läßt sich nicht erkennen.

2. Keimbestimmung

In 95 % aller Sputumproben waren vergr. Streptokokken zu finden (Abb. II). An Häufigkeit folgten Strep. faecalis mit 36 % und Staph. epidermidis mit 29 %, N. catarrhalis und Pseudomonas Spezies mit 25 % bzw. 22 %. Die für die chronische Bronchitis als typisch geltenden Keime wie H. influenzae und D. pneumoniae wiesen Häufigkeiten von 10 % und 7 % auf. Haemophilus Spezies kamen mit 12 % Häufigkeit vor. Alle anderen Keime wurden mit Häufigkeiten unter 7 % nachgewiesen.

Patienten-Nr.	Lebensalter (Jahre)	Körperge- wicht (kg)	Körperlänge (m)	Entwicklungs- zeit d. Krank- heit (Jahre)	Krankenhaus- aufenthalte	RR systol. (mm Hg)	BSG 1h/2h (mm)	Temperatur (°C)	Leukozyten (10 ⁹ /l)	Diagnosen
37	71	75	1,79	17		175	10 30	35,9	6,9	obstruktive Bronchitis Silikose?
38	34	61	1,70	2	1	120	1 3	36,6	7,1	chr.obstr. Atemwegserkran- kung, seit 17J. Heuschnupfen
39	65	75	1,72	3-5		150	33 70		8,5	obstr. Emphysebronchitis 80% Silikose
40	78	72	1,70	3-5		210	5 13	36,4	9,6	chr.obstr. Emphysebron - bronchitis
41	78									
42	59	53	1,67	10	16	155	20 45	37,0	11,0	chr.obstr. Emphysebron - bronchitis
43	53	85	1,80	5	6	120	3 8	36,2	6,1	chr.obstr. Emphysebron - bronchitis
44	54	65	1,72	3-5		140	4 12		6,7	chr.obstr. Emphysebron - bronchitis
45	74	85	1,79	5	4	120	1 5	36,4	7,7	chr.obstr. Emphysebron - chitis / Rechtsherzversagen
46	70	43	1,67		1	160	48 82	37,4	8,0	Emphysebronchitis/Magen-Ca enterale Blutung

Tab. I: Klinische Daten der Patienten Nr. 37 - 46

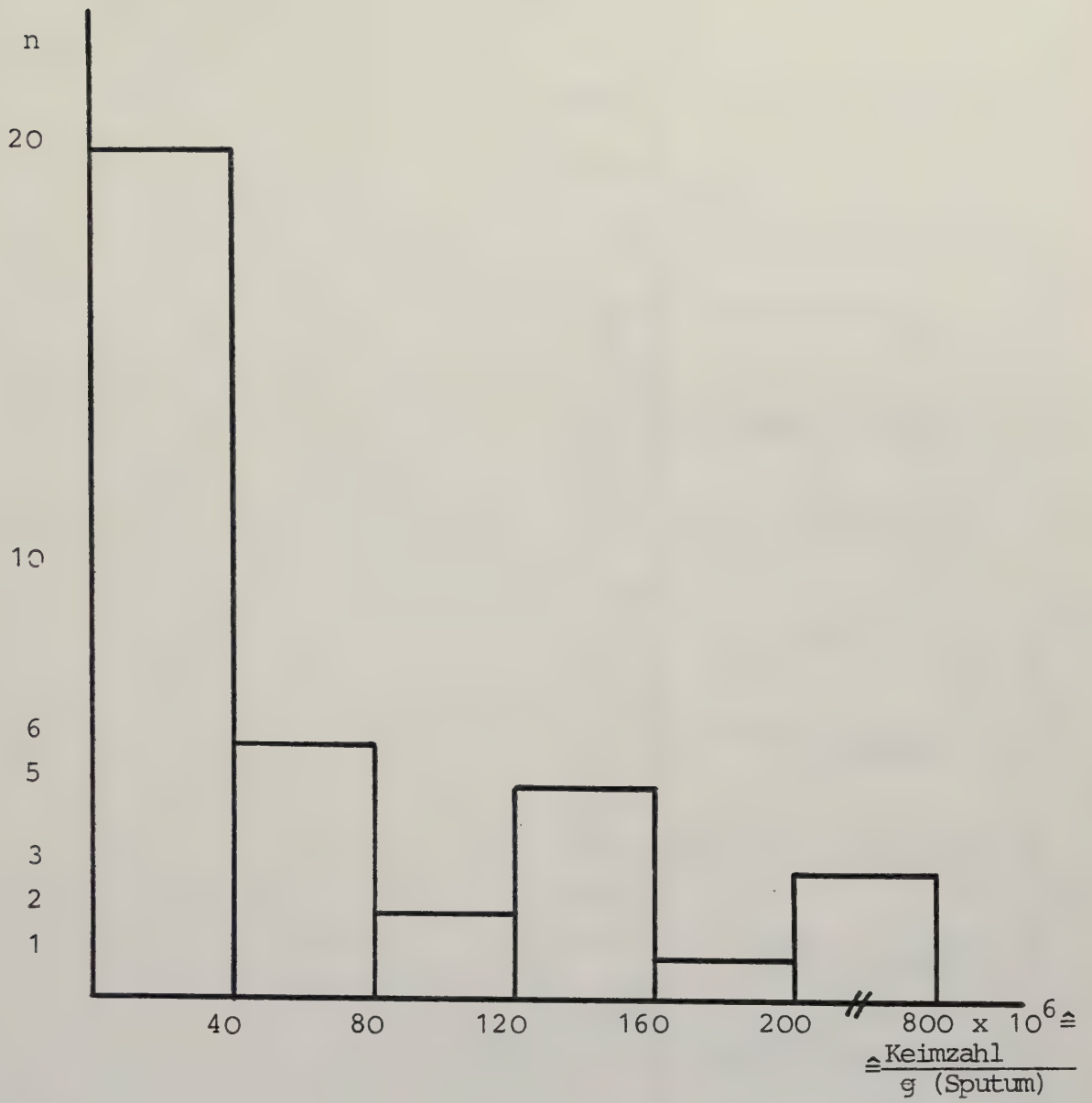


Abb. I: Häufigkeitsverteilung der in den Sputumproben ermittelten Keimzahlen

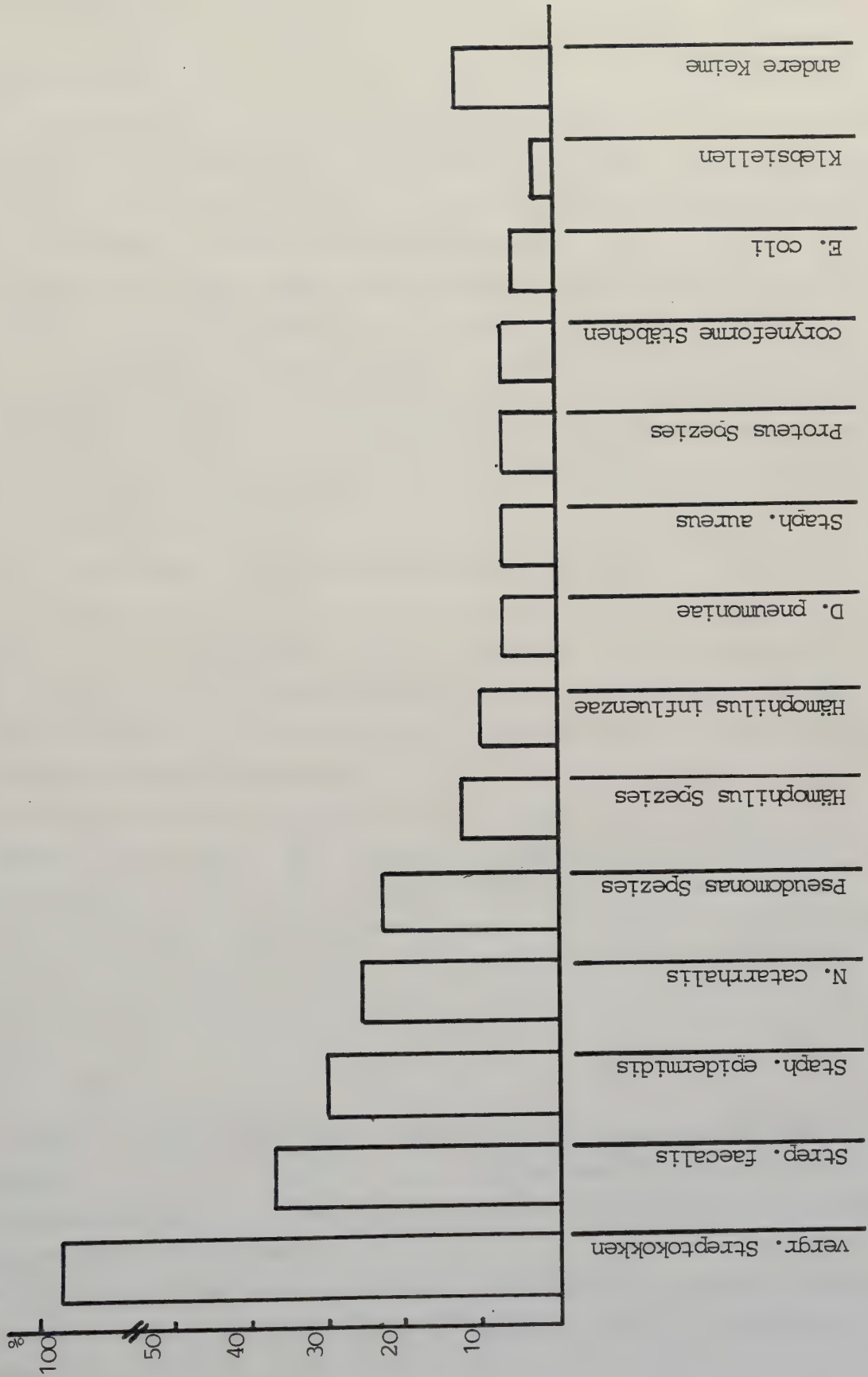


Abb. II: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der aus den Sputumproben anzüchtbaren Keime

III Antikörper

1.a) Sputum

Die Gesamtimmunglobulinbestimmungen wurden für die Klassen IgA und IgG durchgeführt. Die Bestimmung des IgM wurde wegen geringer Konzentrationen und unzuverlässiger Bestimmung mit der benutzten Methode fallen gelassen.

Die Werte für IgA lagen im arithmetischen Mittel bei 0,66 mg/ml (W.H.O.) und für IgG bei 0,15 mg/ml (W.H.O.) (Tab. II - III). Das Histogramm (Abb. III) zeigt für IgA eine um den Mittelwert liegende Normalverteilung. Das entsprechende Histogramm für IgG weist eine einseitig betonte Verteilung auf. Die meisten Werte liegen an der unteren Grenze oder waren nicht bestimmbar.

1.b) Verhältnis Sputumimmunglobuline zu Bakterienspezies

Die Patienten Nr. 1, 3, 40 und 41 hatten H. influenzae im Sputum. Die Konzentrationen des IgA und des IgG lagen bei Nr. 3, 40 und 41 überdurchschnittlich hoch. Jedoch waren im Sputum von Nr. 40 gleichzeitig noch Aeromonas shigelloides und Pseudomonas nachzuweisen.

Die Patienten Nr. 8, 30 und 40 hatten D. pneumoniae im Sputum. Nur bei Nr. 40 wurden wie beschrieben überdurchschnittliche Werte für IgA und auch IgG gefunden.

Ein eindeutiger Hinweis, daß diese oder andere Keimspezies die Sputumimmunglobulinkonzentrationen in einer Richtung beeinflussen, besteht nicht.

2.a) Serum

Im Serum wurden die IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationen bestimmt (Tab. II - III). Die IgA-Konzentration lag mit durchschnittlich 317 mg/dl (W.H.O.) im Normalbereich für Serumimmunglobuline.

Ebenso lagen die Werte für IgG mit durchschnittlich 936 mg/dl (W.H.O.) und für IgM mit 116 mg/dl (W.H.O.) im Normalbereich.

Patienten Nr.	IgA Serum (mg/dl)	IgA Sputum (mg/ml)	IgG Serum (mg/dl)	IgG Sputum (mg/ml)	IgM Serum (mg/dl)	IgM Sputum (mg/ml)	
1		0,24		/		/	
2		0,16		0,2		/	
3		1,20		0,3		/	
4		0,72		0,5		0,04	
5		3,10		0,0		0,00	
6		0,09		0,0		0,00	
7		0,75		1,0		0,00	
8		0,30		0,3		0,00	
9		0,00		0,0		0,00	
10		0,58		0,0		0,00	
11		0,18		0,0		0,00	
12		0,74		0,0		0,37	
13		0,94		0,0		0,39	
14		0,78		0,0		0,05	
15		1,43		0,09		0,06	
16		1,45		0,31		0,04	
17		1,19		0,10		0,04	
18		0,89		0,13		0,06	
19		/		/		/	
20		1,23		0,73		0,07	
21		/		/		/	
22		0,33		0,11		0,04	
23		6,10		0,25		0,17	
24		1,62		0,00		0,10	

Tab. II: Immunglobulinkonzentrationen im Serum bzw. Sputum
der untersuchten Patienten

Patienten Nr.	IgA Serum (mg/dl)	IgA Sputum (mg/ml)	IgG Serum (mg/dl)	IgG Sputum. (mg/ml)	IgM Serum (mg/dl)	IgM Sputum (mg/ml)
25	1025	0,71	820	0,00	103	0,02
26	174	1,02	520	0,04	55	0,00
27	/	/	/	/	/	/
28	/	/	/	/	/	/
29	248	1,05	900	0,10	139	0,00
30	175	0,25	786	0,11	125	0,00
31	410	0,17	995	0,00	103	0,00
32	318	0,89	986	0,14	167	0,04
33	518	1,12	814	0,34	50	0,00
34	460	0,82	667	0,25	43	0,00
35	350	0,31	1106	0,00	54	0,00
36	557	0,32	823	0,19	167	0,00
37	665	1,75	1340	0,00	102	/
38	667	0,00	1270	0,29	135	/
39	340	0,69	1020	0,25	129	/
40	158	1,35	1140	0,21	175	/
41	572	1,80	1360	0,33	45	/
42	230	0,97	550	0,00	56	/
43	410	1,78	900	0,00	225	/
44	865	0,71	1240	0,00	81	/
45	900	1,18	1355	0,19	120	/
46	700	1,33	1022	0,00	116	/
$\bar{x}$	487	1,01	981	0,16	110	(Hyland)
$\bar{x}$	317	0,66	936	0,15	116	(W.H.O.)

Tab.III: Immunglobulinkonzentrationen im Serum bzw. Sputum
der untersuchten Patienten

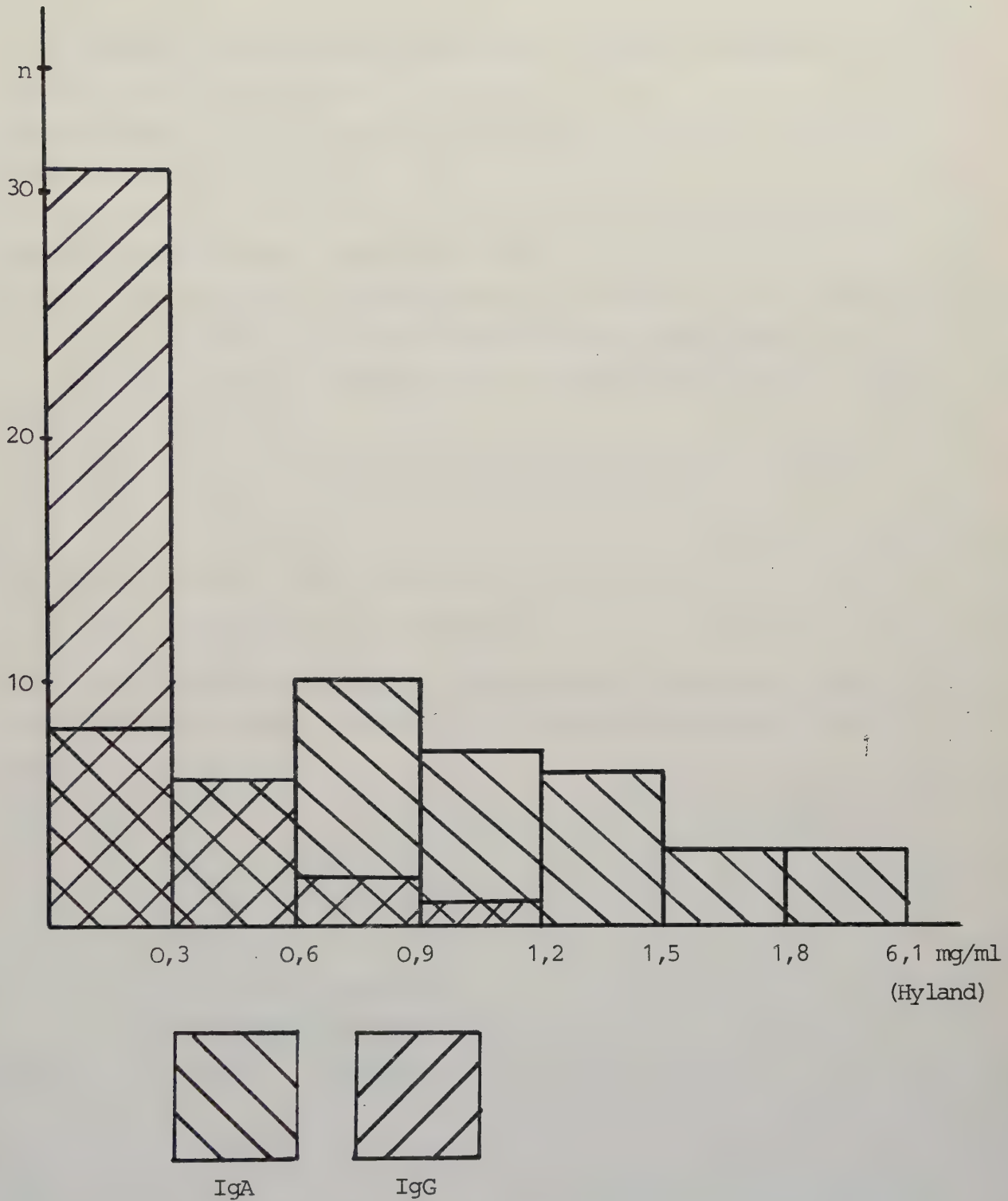


Abb. III: Häufigkeitsverteilung der IgA- bzw. IgG-Konzentrationen im Sputum

2.b) Verhältnis Serumimmunglobuline zu Bakterienspezies

Patient Nr. 40 hatte H. influenzae im Sputum mit vergleichsweise hohen IgG- und IgM-Werten, während das IgA eher als niedrig zu bewerten ist.

Patient Nr. 41 hatte ebenfalls H. Influenzae im Sputum mit überdurchschnittlich hohem IgA und IgM.

Patient Nr. 30, mit D. pneumoniae im Sputum, bietet nur durchschnittliche oder niedrige Immunglobulinkonzentrationen.

Nr. 40, ein anderer Patient mit D. pneumoniae hat die oben angeführten Werte.

Auch aus diesen Werten läßt sich keine eindeutige Tendenz ableiten.

IV Immunfluoreszenzuntersuchungen

1.a) Immunfluoreszenzen im Sputum

Alle Sputumproben wurden auf spezifische Antikörper gegen die aus derselben Probe angezüchteten Keime ausgetestet. Ein Ergebnis fällt auf:

Nur die Minderheit der Proben zeigt eine positive Immunfluoreszenz als Ausdruck einer spezifischen Antikörperbindung.

Von den 65 Immunfluoreszenzen in den letzten beiden Patientenkollektiven von Nr. 25 - 46

waren 46 negativ,

10 unsicher positiv,

5 deutlich positiv

und 4 stark positiv.

1.b) Verhältnis von positiven Immunfluoreszenzen im Sputum zu Bakterienspezies

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzen gegen H. influenzae bzw. D. pneumoniae waren negativ oder nur unsicher positiv. Hingegen erzeugten vergr. Streptokokken deutlich positive Ergebnisse in den Patienten Nr. 33, 36, 37, 38 und 43. Gegen Staph. epidermidis zeigt Nr. 44 eine deutlich positive Immunfluoreszenz.

Gegen E. coli hat Nr. 36 eine stark positive Immunfluoreszenz.

Nr. 32 weist eine positive Immunfluoreszenz gegen eine Pseudomonasspezies auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Anzahl apathogener, commensaler Keimspezies regelmäßig spezifische Antikörperbindungen von IgA im Sputum hervorriefen, während typische Entzündungskeime der chronischen Bronchitis in deutlicher Diskrepanz dazu keine oder nur fragliche spezifische Antikörperbindungen hatten.

1.c) Verhältnis positiver Immunfluoreszenzen im Sputum zu Immunglobulinkonzentrationen im Sputum

Patient Nr. 32 zeigt die schon erwähnte Immunfluoreszenz gegen Pseudomonas, fraglich positive Ergebnisse gegen N. catarrhalis und vergr. Strep.. IgA und IgG im Sputum sind durchschnittlich hoch.

Patient Nr. 33 zeigt eine positive Immunfluoreszenz vergr. Strep.. IgA und IgG im Sputum sind überdurchschnittlich hoch.

Patient Nr. 36 zeigt stark positive Immunfluoreszenzen gegen E. Coli und vergr. Strep.. Das Sputum-IgA ist niedrig.

Patient Nr. 37 hat eine positive Immunfluoreszenz gegen vergr. Strep.. Das Sputum-IgA ist erhöht.

Patient Nr. 38 weist eine positive Immunfluoreszenz gegen vergr. Strep. auf. Das Sputum-IgA ist unbestimmbar niedrig.

Patient Nr. 43 zeigt eine positive Immunfluoreszenz gegen vergr. Strep.. Das Sputum-IgA ist erhöht.

Patient Nr. 44 hat eine positive Immunfluoreszenz gegen Staph. epidermidis. Das Sputum-IgA ist niedrig.

Zusammenfassend folgt aus diesem Vergleich, daß positive Immunfluoreszenzen als Ausdruck spezifischer Antikörperbindungen sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Sputum-IgA-Konzentrationen registriert wurden.

2.a) Serum-Immunfluoreszenzen

Die Immunfluoreszenzen im Serum, die zu Vergleichszwecken angefertigt wurden, zeigen regelmäßig positive Immunfluoreszenzen. In Abb. IV ist die prozentuale Verteilung der in den Immunfluoreszenzen zusammenwirkenden Immunglobulinklassen angegeben. In 22 % der untersuchten Immunfluoreszenzen findet sich in keiner Immunglobulinklasse ein positives Ergebnis. In ca. 60 % der Immunfluoreszenzen haben mehrere Immunglobulinklassen Antikörper gegen einen Keim.

Außerdem sind die Titer in der Klasse IgG durchschnittlich größer als die in der Klasse IgM, die ihrerseits wiederum größer waren als die IgA-Titer.

2.b) Verhältnis positiver Immunfluoreszenzen zu Bakterien- spezies

Im Rahmen dieser Untersuchungen nehmen Keime wie H. influenzae oder D. pneumoniae keine besondere Rolle bezüglich der Antikörpertiter im Serum ein.

Auch ein Zusammenhang zwischen anderen Keimspezies und Serumantikörpertitern läßt sich nicht nachweisen.

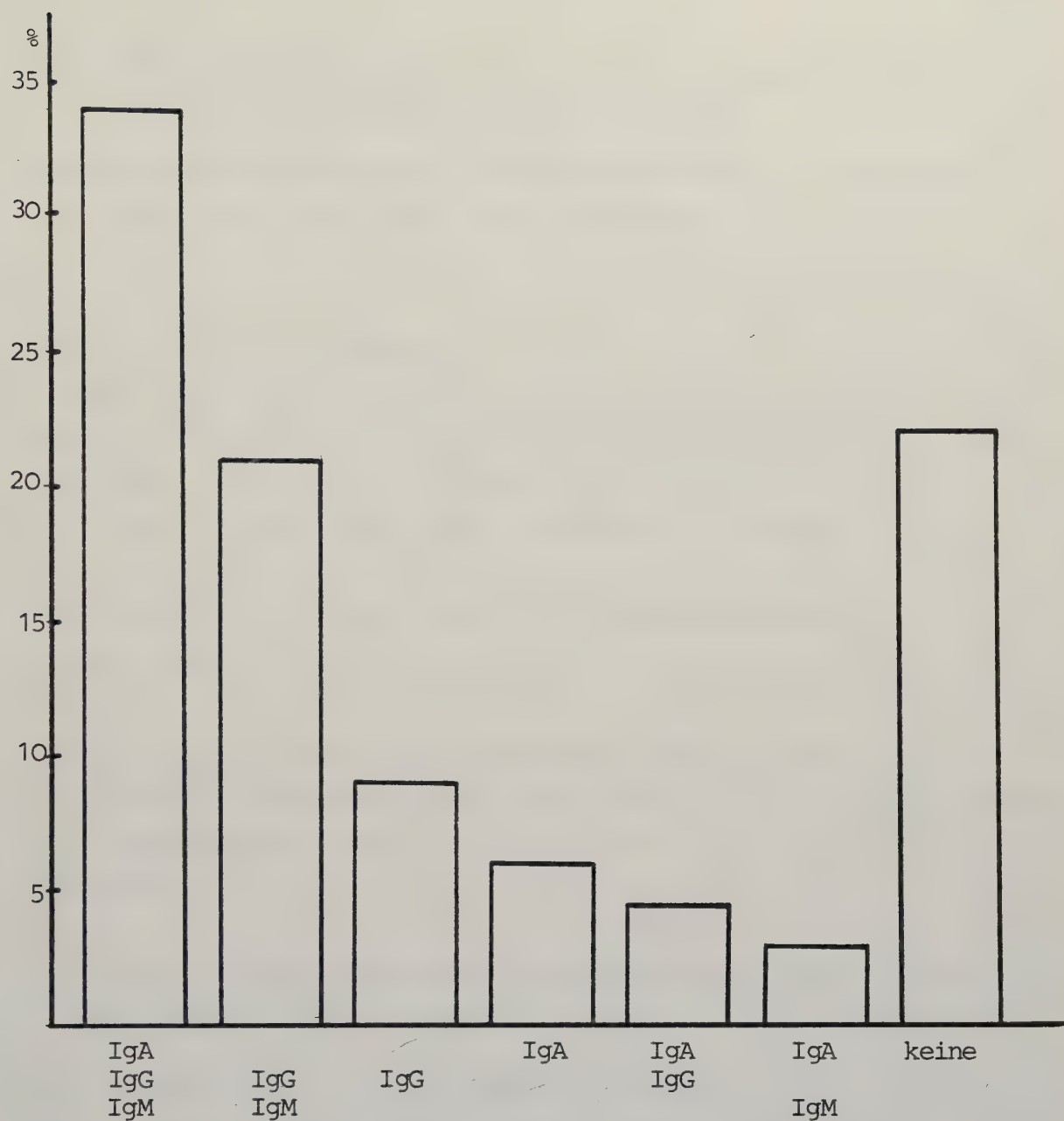


Abb. IV: Beteiligung der verschiedenen Immunglobulinklassen
an den positiven Immunfluoreszenzen im Serum
In 22 % der Immunfluoreszenzen lagen negative
Ergebnisse vor. D.h.: keine Immunglobulinklasse
war beteiligt.

2.c) Verhältnis positiver Serumimmunfluoreszenzen zu Immunglobulinkonzentrationen im Serum

Ein Zusammenhang zwischen Immunfluoreszenzen und Immunglobulinkonzentrationen ist nicht erkennbar.

V Solid-Phase-Bindungstest

Im SPBT (Tab. IV, Abb. V) fällt auf, daß in einigen Sputen gegen alle vorgelegten Keime, patienteneigenen oder -fremden, hohe (Nr. 37, 42), andere niedrige (Nr. 46, 40, 45 und 41) und der Rest mittlere Antikörpertiter haben.

1. Verhältnis der SPBT-Titer zu Bakterienspezies

Der Höhe der Titerwerte sind keine speziellen Bakterien zuzuordnen.

Die einzelnen Sputen erzeugen gegen jeweils eine vorgelegte Bakterienspezies Antikörpertiter von 22 bis 63, welche den Verdünnungsstufen des Sputums von 1:22 bis 1:63 entsprechen.

2. Verhältnis der SPBT-Titer zu Immunglobulinkonzentrationen im Sputum

Die Patienten mit den durchschnittlich höchsten Titern (Nr. 37, 42) haben IgA-Konzentrationen im Sputum von 1,75 mg/ml bzw. 0,97 mg/ml (Hyland).

Damit sind die Werte für Nr. 37 überdurchschnittlich hoch, für Nr. 42 mäßig erhöht.

Die Patienten mit den niedrigsten Titern (Nr. 46, 40, 45, 41) haben alle überdurchschnittlich hohe IgA-Konzentrationen. Damit läßt sich auch hier kein Zusammenhang herstellen zwischen Antikörpertitern und Immunglobulinkonzentrationen.

Pat.-Nr. Sputum	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
Pat.Nr. Keim												
37 vergr. Streptok.	120	32	38	6,5	9	105	100	66	40	7	52	14
37 Strep. faecalis	120	20	40	32	28	155	60	63	12	5	54	15
37 vergr. Strep.	140	29	45	12	33	140	65	65	32	6,2	57	14
38 vergr. Strep.	90	32	46	22	20	60	80	50	30	7	44	8
38 Staph. aureus	50	58	21	9	6	400	30	44	7,5	2,2	63	38
39 Mikrokokken						21	40	40	6	5,2	22	2
39 Staph. epidemicus	270	17	50	21	3	70	41	40	40	5	56	25
40 D. pneu - moniae	120	20	32	20	15	65	50	36	12	3,6	37	11
40 H. influ - enzae	47	32	46	29	24	38	40	40	24	5,5	33	4
41 H. influ - enzae	130	40	32	24	55	75	36	38	20	4,3	45	11
44 H. parain- fluenzae	100	15	22	22	24	50	50	37	11	4,7	34	9
45 N. catar - rhialis	58	27	19	16	15	24	34	23	4	2,3	22	5
$\bar{x}$	113	29	36	19	21	100	52	45	20	5		
$s_{\bar{x}}$	13	4	3	2	4	30	3	4	3	0,5		

Tab. IV: In der Tabelle sind die reziproken Verdünnungswerte des Sputums als Titer gegen die vorgelegten Keime bei 40 % Bindung im SPBT aufgeführt.

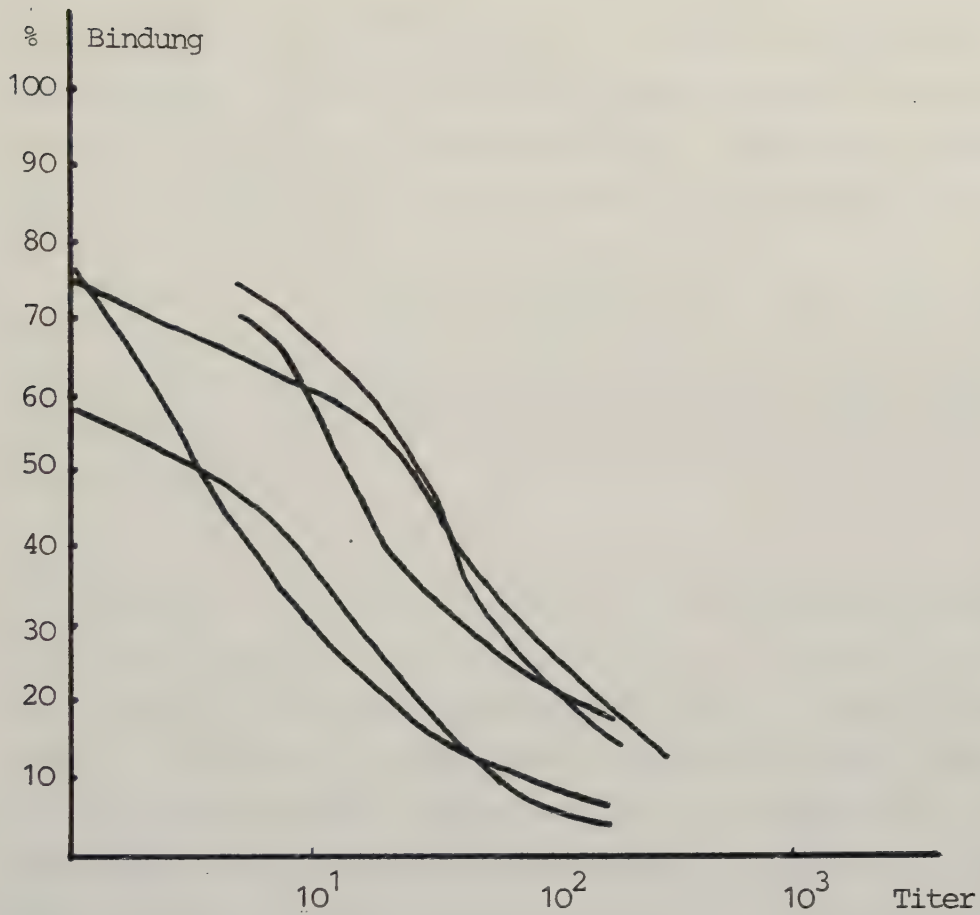


Abb. V: Beispiel einer Bindungskurvenschar im Solid-Phase-Bindungstest:
Mikrokokken von Nr. 39 gegen die Sputum-
proben Nr. 42 - 46 (Siehe auch Tab. IV!).
Die reziproken Verdünnungswerte der Sputen
sind als Titer auf die Abszisse aufgetragen.

3. Verhältnis von SPBT-Titern zu Immunfluoreszenzen

Sputumproben von Patienten mit durchschnittlich hohen Titern zeigen in der Immunfluoreszenz nicht häufiger positive Ergebnisse als solche Sputumproben, die niedrige Titer im SPBT aufweisen.

Im Gegensatz zum Immunfluoreszenztest werden im SPBT auch dann noch Titer gefunden, wenn dort nur negative oder fraglich positive Ergebnisse erscheinen. Das würde die Auffassung stützen, daß dieser Test empfindlicher als die Immunfluoreszenztechnik ist.

4. Verhältnis von SPBT-Titern zur Klinik der Patienten

Hier kann bemerkt werden, daß die Patienten mit der vergleichsweise längsten Entwicklungsdauer ihrer Krankheit (Tab. I) die durchschnittlich höchsten Titer haben.

Der Patient mit den durchschnittlich niedrigsten Titern verstarb 8 Tage nach Probenentnahme. Er litt an einem begleitenden Magen-Carcinom und erlitt eine tödliche enterale Blutung. Zwei weitere Patienten (Nr. 40 und 45) mit niedrigen Titern haben eine Entwicklungszeit von mehreren Jahren ihrer chronischen Bronchitis. Der Patient Nr. 45 verstarb an einem Rechtsherzversagen, ein Vierteljahr nach der Probenentnahme.

D DISKUSSION

I Klinik

Eine chronische Bronchitis nach der international gültigen Definition des Medical Research Councils (1965) besteht dann, wenn ein chronisches oder akut rezidivierendes Ansteigen der mukösen Bronchialflüssigkeit eintritt, das zum Abhusten führt. Eine Bronchitis kann erst dann chronisch genannt werden, wenn der Patient an den meisten Tagen während drei aufeinanderfolgender Monate in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Jahren Sputum abhustet.

Andere Lungenerkrankungen, die auch mit Auswurf verbunden sind, müssen ausgeschlossen werden. Dazu gehören Tuberkulose, Pneumonien, Bronchiektasen, pulmonale Granulomatosen, Pneumokoniosen und kardiovaskuläre oder renale Erkrankungen. Die untersuchten Patienten entsprachen weitgehend diesen Forderungen. Einige litten jedoch zusätzlich unter Silikose. Sie hätten entsprechend der Definition ausgeschlossen werden müssen.

Eine weitere Unterteilung der chronischen Bronchitis in eine einfache (Hauptmerkmal: muköses Sputum), mukopurulente (mit mukopurulentem Sputum) und chronisch obstruktive Bronchitis ist hier nicht vorgenommen worden. Sie könnte durch gezielte Fragen zur Anamnese und durch spirometrische Daten erreicht werden.

II Mikrobiologische Untersuchungen

1. Materialgewinnung

Beim Abhusten des Bronchialschleimes läßt sich nicht vermeiden, daß Sputum aus dem Bronchialtrakt mit Saliva vermengt wird. Außerdem kommt es in Kontakt mit verschiedenen Teilen des oropharyngealen Raumes. Dementsprechend werden Keime aus den betreffenden Regionen beigemengt. Gleichermaßen werden in verschiedenen Mengen Immunglobuline aus Saliva beigemischt.

Alle Sputen wurden gewaschen, um so den viskösen Bronchialschleim von seinen dünnflüssigen Beimengungen und Verunreinigungen zu trennen.

Bartlett und Findgold (1978) benutzten fließendes Wasser zur Reinigung ihrer Sputumproben. Diese Methode ist offensichtlich intensiver als die hier verwendete. Sie erreichten eine Herabsetzung der Verunreinigung mit Keimen aus dem oropharyngealen Raum um den Faktor 100 für durchschnittlich alle Sputen. Durch den Vergleich mit transtrachealen Aspiraten ergab sich, daß 26 % der gewaschenen Sputen immer noch durch Keime aus dem oropharyngealen Raum mit Keimzahlen von mehr als 10^6 /ml verunreinigt waren.

Haas et al. (1977) fanden im Vergleich von transtrachealer Aspiration, Bronchoskopie und Sputumgewinnung durch Abhusten, daß mit allen drei Methoden zuverlässig der Nachweis von *H. influenzae* und *D. pneumoniae* erfolgte.

Eingeschränkt wird diese Behauptung durch Burns und May (1967), die aufgrund eigener Untersuchungen den Standpunkt vertreten, daß ein Keim wie *H. influenzae* häufig trotz Vorhandenseins nicht isoliert würde.

Diese Aussagen verschiedener Autoren lassen den Schluß zu, daß mit der hier verwandten Methode der Sputumgewinnung durch Expektoration der überwiegende Teil der Keime des Bronchialtraktes nachweisbar ist. Es muß aber mit Verunreinigungen durch Keime aus anderen Regionen gerechnet werden. Selbst mit intensiveren Waschmethoden wäre die Verunreinigung des Sputums nicht beseitigt.

2. Keimzahl

Im Rahmen der Keimbestimmung wurde die Gesamtkeimzahl pro ml Sputum bestimmt. Diese Bestimmung kann von Interesse sein, wenn es um die Beurteilung geht, ob eine akute Exazerbation einer chronischen Bronchitis besteht. Wesentlicher wäre es aber zu wissen, in welcher Größenordnung die einzelnen Keimspezies an der Besiedlung des Bronchialtraktes beteiligt sind.

Bartlett und Finegold benutzten in der oben zitierten Arbeit die Keimzahl der verschiedenen Spezies als Hilfskriterium zur Unterscheidung von Keimen aus dem Bronchialtrakt und dem Mund-Rachenraum.

Die Gesamtkeimzahlbestimmung, wie sie in dieser Arbeit erfolgte, ist wegen der oben diskutierten Verunreinigung zur Beurteilung einer akuten Exazerbation ungeeignet.

3. Keimbestimmung

Die Bestimmung der Keime ergab, daß vergr. Streptokokken in 95 % der Fälle im Sputum zu finden waren. Andere Keime wie *Strep. faecalis*, *Staph. epidermidis*, *N. catarrhalis* kamen regelmäßig vor.

Die für die chronische Bronchitis typischen Keime wie *H. influenzae* und *D. pneumoniae* kamen zu 10 % und 7 % in den Sputen vor.

Lees und McNaught (1959) nennen Häufigkeiten für die beiden Keime von 60 % und 53 % im Sputum. Eine neuere Arbeit, die von Schreiner et al. (1978) stammt, nennt Häufigkeiten von 30 % und 25 %.

Eine Untersuchung von Burns (1972) aus Australien weist Häufigkeiten von 12 % und 4,8 % auf.

Lees und McNaught verarbeiteten das Sputum innerhalb einer Stunde nach Expektoration. Schreiner et al. brachten das Material sofort nach Expektoration in ein spezielles Transportmedium und verarbeiteten es innerhalb von vier Stunden. Mit großer Wahrscheinlichkeit macht sich in der vorliegenden Arbeit negativ bemerkbar, daß das Sputum nicht direkt nach Expektoration zur Verarbeitung gelangte und auch in keinem Transportmedium aufbewahrt wurde. Die vergleichsweise geringere Anzüchtungsrate für die typischen Keime wird darauf zurückzuführen sein.

Ob auch dem Zeitpunkt der Entnahme im Verlauf einer akuten Exazerbation eine Bedeutung für die Anzüchtungsrate von Keimen hat, kann nicht gesagt werden. Zu diesem Zweck wäre es notwendig, daß der Patient beim ersten Auftreten der Symptome zur Sputumentnahme käme und dann im Verlauf der Exazerbation und Remission beobachtet würde. Reichek (1970) wies seine Patienten an, bei Auftreten akuter Symptome sich zur Sputumentnahme in der Klinik zu melden.

Die Ergebnisse für die Keimbestimmung der anderen genannten Spezies lagen im Rahmen dessen, was auch von anderen Autoren angegeben wird.

Haas et al. (1977) berichten über transtracheale Aspirate bei 24 Patienten. In 6 Fällen fanden sie vergr. Strep. , in 2 Neisserien, in 2 Enterobakterien neben 14 Fällen mit *H. influenzae* und 9 mit *D. pneumoniae*.

Die Mehrzahl der anderen Autoren berücksichtigen von vornherein sogenannte apathogene Keime nicht.

Burns (1972) nennt neben den schon erwähnten Häufigkeiten für *H. influenzae* und *D. pneumoniae* Häufigkeiten von 2,7 % für *Staph. aureus*, 15,6 % für Enterobakterien und 9.7 % für *Pseudomonas aeruginosa*.

Die in dieser Arbeit fast immer vorhandenen vergr. Strep. sind in diesem Maße nirgendwo vergleichbar aufgeführt. Ob diese Häufigkeit allein auf oropharyngeale Verunreinigungen zurückzuführen ist, oder ob dieser Keim im verstärkten Ausmaße in den Bronchien vorkam, kann nicht unterschieden werden.

III Immunglobulinbestimmung

Im Sputum wie im Serum wurden die Immunglobulinkonzentrationen der Klassen A und G bzw. A, G und M durchgeführt. Wie schon beschrieben, muß aufgrund des Abhustens damit gerechnet werden, daß Immunglobuline aus Saliva beigemischt waren. Jedoch greift auch hier wie bei den Bakterien der Waschvorgang des Sputums ein, der den Großteil der Salivabestandteile entfernt.

Die Immunglobulinbestimmungen wurden mittels Laser-Nephelometrie vorgenommen, die mittlerweile durch verschiedene Arbeiten bekannt ist und als zuverlässig gilt (Sieber, 1977; Sieber & Gross, 1976).

Die für die einzelnen Immunglobulinklassen erzielten Werte ließen sich in keinen Zusammenhang mit der Klinik oder Bakteriologie der Patienten setzen.

Die Bestimmung der Serumimmunglobuline ist im Gegensatz zur Bestimmung der Sputumimmunglobuline eine Routinemethode. Bei der Bestimmung der Sputumimmunglobuline kommt hinzu, daß die Werte auf einen 7-S-IgA Serumstandard bezogen gemessen wurden und somit die wahre 11-S-IgA-Sputum-Konzentration unterschätzt wurde.

Falk et al. (1972) und Gump (1973) weisen auf diesen Umstand hin. Medici und Bürgi (1971) gehen auch auf diesen Meßfehler ein. Sie stellen fest, daß die bronchiale IgA-Konzentration in einem Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Patienten steht. Diese Annahme konnte aber in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Die Ergebnisse der Sputum-IgA-Konzentrationen stimmen mit den Werten ähnlicher Untersuchungen überein (Szabo et al., 1973; Rasche, 1971). Die Werte des IgG im Sputum lagen deutlich unter denen dieser Arbeiten.

Ein Zusammenhang zwischen der Höhe von Immunglobulinkonzentrationen verschiedener Klassen in Sputum und Serum ließ sich nicht nachweisen. Deuschl und Johansson (1974) weisen in ihrer Arbeit auf den fehlenden Zusammenhang zwischen Serum- und Sputumimmunglobulinen hin.

In der vorliegenden Arbeit läßt sich weiterhin kein Zusammenhang zwischen der Höhe irgendwelcher Sputum- und Serumimmunglobuline und der aktuellen Infektion mit speziellen Keimen herstellen. Clarke (1976) hat in diesem Zusammenhang gefunden, daß Patienten mit wenig Eiter (als Zeichen der Entzündung) im Sputum niedrigere IgG-Spiegel im Serum haben als solche mit viel Eiter im Sputum.

IV Antikörperbindungen

1. Antikörperbindungen an Bakterienantigenextrakten

Weil dieses Arbeitsgebiet für die Beurteilung und Einordnung der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse von Bedeutung ist, wird es hier vorab diskutiert.

In den sechziger Jahren wurde erkannt, daß die Keimbestimmung im Sputum ein heikles Kriterium zur Beurteilung des Vorhanden- und Wirksamseins von Keimen bei der chronischen Bronchitis ist. Aus diesem Grunde bemühten sich Burns und May (1967) um eine indirekte, immunologische Methode, um der pathogenen Wirkung von gewissen Keimen auf die Spur zu kommen.

Sie verwendeten Standardantigenextrakte, beispielsweise von *H. influenzae*, und ließen sie in einer Gel-Doppeldiffusion - später auch in einer Immunelektrophorese oder Radioimmunelektrophorese - mit Serumantikörpern von chronischen Bronchitikern und anderen chronisch Lungenkranken reagieren.

Sie stellten regelmäßig präzipitierende Antikörper gegen Antigene von *H. influenzae* im Serum von Patienten mit chronischer Bronchitis fest. Die Ergebnisse standen in einem signifikanten Kontrast zu den in Kontrollgruppen erzielten. Auch gegen Pneumokokkenantigenen wurden Antikörper nachgewiesen, jedoch nicht in der Signifikanz wie für *Hämophilus*-antigene. Diese indirekt über die Immunglobuline getroffenen Aussagen über das Wirken von Keimen sind unabhängig von der bakteriellen Sputumkultur. Die Ergebnisse stützten die aus Sputumkulturen gewonnene Erkenntnis, daß es sich bei *H. influenzae* und *D. pneumoniae* um zwei typische Keime der chronischen Bronchitis handelt. In den folgenden Jahren wurden diese Untersuchungen weitergeführt (Burns, 1968a, b; Burns & May, 1968; Burns, 1972; May, 1975; Nicholls et al., 1975; Davies, R.J. et al., 1976; Davies, J.L. et al., 1974).

Clarke (1975) griff die von Burns entwickelte Methode in einer veränderten Form auf: Da man tierexperimentell zu der Ansicht gekommen war, daß Sputumantikörper gegen Standardantigenextrakte besser das aktuelle Wirken eines Keimes im Bronchialtrakt wiedergeben als Serumantikörper, übernahm Clarke dieses System für die chronische Bronchitis. Er fand, daß im Gegensatz zum Serum eine große Zahl von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen keine präzipitierenden Antikörper im Sputum haben. Er vermutet weiter, daß neben den lokal produzierten Antikörpern noch andere lokale Faktoren zur Bekämpfung bakterieller Infekte im Bronchialtrakt notwendig sind.

1976 wiederholte er diese Untersuchung. Dieses Mal hatte er das Sputum durch Dialyse und Hochgeschwindigkeitszentrifugation von den Immunglobulinen getrennt. Und wieder zeigte sich die Diskrepanz von Präzipitaten im Serum zu den Präzipitaten im Sputum, insbesondere bei *H. influenzae*.

2. Indirekte Immunfluoreszenz

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung von Antikörperbindungen mit Sputum und Serum an unzerstörte Bakterien die indirekte Immunfluoreszenztechnik gewählt. Diese Methode wird routinemäßig zur Bestimmung spezifischer Antikörper und deren Titer gegen bestimmte Bakterienspezies in der Klinik eingesetzt. Die mit diesem Test erzielten Titer korrelieren gut mit dem klinischen Verlauf der jeweils beobachteten Infektion.

Auch bei der Frage nach Antikörpern gegen verschiedene Bakterien im Rahmen der chronischen Bronchitis wurde dieser Test von anderen Autoren eingesetzt (Reichek, 1970; Gump, 1973).

Ziel dieser Arbeit war es, mit dem indirekten Immunfluoreszenztest alle aktuell in einer Sputumprobe vorhandenen und anzüchtbaren Bakterienspezies auf spezifische IgA-Antikörper aus derselben aktuellen Probe zu testen. Wie schon beschrieben, fiel eine deutliche Diskrepanz zwischen den Serumantikörpern

und den spezifischen Sputumantikörpern auf: Im Sputum konnten nur selten spezifische Antikörper nachgewiesen werden, während im Serum regelmäßig gegen die vorgelegten patienteneigenen Bakterien Antikörper nachgewiesen wurden. Weiterhin fiel auf, daß die positiven Immunfluoreszenzen als Ausdruck einer spezifischen Bindung im Sputum gegen Keime wie vergr. Strep. , Staph. epidermidis und E. coli erfolgten. Diese Keime werden zu den commensalen oder apathogenen Spezies gerechnet.

Die typischen Bronchitisekeime wie H. influenzae und D. pneumoniae erzeugten nur negative oder unsicher positive Ergebnisse.

Reichek isolierte aus Sputumproben nur die sogenannten pathogenen Keimspezies und testete ihre Bindung mit Serumantikörpern der Immunglobulinklassen G und M des zugehörigen Patienten. Wenn im Sputum seiner Patienten kein H. influenzae anzüchtbar war, bestimmte er die Bindung mit einem dafür verfügbaren Stamm. Er beobachtete während 56 Exazerbationen mit H. influenzae im Sputum 18 Fälle mit vierfachen Titeranstiegen nach 3 Wochen. Ansteigende Titer gegen Pneumokokken wurden in 3 von 11 Fällen beobachtet.

Die von Reichek benutzte Methodik, besonders die der Anfertigung der bakterienbeschichteten Objektträger und das Auftragen der Antikörper und die Waschvorgänge stimmen mit der hier verwendeten fast überein.

Im Gegensatz zu Reichek wurden in der vorliegenden Arbeit keine Titerverläufe im Serum beobachtet, weil das ursprüngliche Konzept der Arbeit als Schwerpunkt die Bestimmung von spezifischen IgA-Antikörpern im Sputum vorsah.

Gump führte im indirekten Immunfluoreszenztest Antikörperbindungsversuche durch, indem er aus Sputum gewonnene Antikörper oder Serumantikörper mit einem unbekapselten H. influenzae reagieren ließ. Das Bakterium stammte aus dem Sputum eines der Patienten. Nur einmal konnte ein vierfacher Titeranstieg von Serumantikörpern gegen H. influenzae beobachtet werden. Dieser Hämophilusstamm kam von einem der Patienten und wurde für alle weiteren Versuche benutzt.

Am häufigsten reagierten IgG-Antikörper mit dem Keim, es folgten an Häufigkeit Reaktionen mit IgM- und IgA-Antikörpern aus dem Serum.

Diese Beobachtung stimmt mit in dieser Arbeit gemachten Feststellungen überein: Im Serum wurden die häufigsten positiven Immunfluoreszenzen der Klasse IgG beobachtet, dann folgten IgM und IgA.

Gump wies in 21 von 24 Sputumproben aus 9 Patienten IgA-Antikörper gegen den einen Hämophilusstamm nach.

Obwohl er regelmäßig Antikörper gegen den Hämophilusstamm nachwies, konnten in 25 - 88 % der Sputumproben *H. influenzae* angezüchtet werden.

Im Gegensatz zu dieser Arbeit gewann Gump das Sputum, indem er mit vernebelter NaCl-Lösung den Bronchialtrakt zur Sekretion reizte und dann abhusten ließ.

In der Zusammenschau der Ergebnisse stellt sich folgendes Bild dar:

Im Einklang mit den Ergebnissen der Literatur kann gesagt werden, daß im Serum regelmäßig Antikörper gegen im Sputum chronischer Bronchitiker vorkommende Bakterien gefunden werden. Es kann sich dabei sowohl um sogenannte pathogene als auch apathogene - wie hier nachgewiesen - Spezies handeln.

Im Sputum zeigt sich mit verschiedenen Methoden dazu einheitlich eine deutliche Diskrepanz. Wenn Gump auch in 21 von 24 Fällen eine Antikörperbindung im Sputum nachweist, so muß ihm vorgehalten werden, daß er nur einen einzigen Hämophilusstamm benutzte. Somit kann die individuell in einem Patienten stattfindende spezifische Immunantwort gar nicht angemessen beurteilt werden.

Wie in dieser Arbeit deutlich wurde, scheinen gegen die natürlicherweise dauernd vorhandenen apathogenen Bakterien-spezies regelmäßig spezifische Antikörper vorhanden zu sein. Hingegen wurden gegen typische Keime wie *H. influenzae* und *D. pneumoniae* keine oder nur fragliche spezifische Antikörper beobachtet. Diese Erscheinung läßt sich möglicherweise auf den bei der chronischen Bronchitis bekannten Erregerwechsel zurückführen. Ellis et al. (1978) berichteten, daß fast jede Exazerbation durch einen anderen Erreger oder eine andere antigene Variante des vorhergehenden Erregers ausgelöst wird.

3. Solid-Phase-Bindungstest

Da im Immunfluoreszenztest in vielen Fällen keine spezifischen Antikörper der Klasse IgA nachweisbar waren, wurde ein Teil dieser Versuche mit dem vermeintlich empfindlicheren SPBT wiederholt. Verschiedene andere Autoren (Granfors et al., 1978; Shibata et al., 1978) hatten bei ähnlichen Fragestellungen mit Solid-Phase-Assays brauchbare Ergebnisse erzielt.

Wie beabsichtigt, ließen sich in allen Fällen im SPBT Antikörperbindungen der Klasse IgA im Sputum gegen patienteneigene und patientenfremde Bakterien nachweisen.

Die Patienten mit den durchschnittlich höchsten Titern gegen alle vorgelegten Bakterien scheinen die vergleichsweise längste Entwicklungsdauer ihrer Krankheit zu haben. Dies könnte mit dem über die Jahre oftmals stattgefundenen Erregerwechsel erklärt werden: Im Laufe der Jahre haben diese Patienten ein ganzes Keimspektrum kennengelernt und gegen dieses auch spezifische Antikörper entwickelt.

Die Patienten mit einer eindeutig kürzeren Entwicklungsdauer ihrer Krankheit scheinen auch durchschnittlich niedrigere Titer zu besitzen.

V. Ausblick

Da gegen die typischen Keime der chronischen Bronchitis, *H. influenzae* und *D. pneumoniae*, keine spezifischen IgA-Antikörper in deutlichen - ursprünglich erwarteten - Titern vorhanden sind, wird ihre Bedeutung als Entzündungskeime im Rahmen der chronischen Bronchitis verständlicher.

Ob jedoch die Entzündung zurückgedrängt werden könnte, wenn spezifische IgA-Antikörper in höheren Titern vorhanden wären, bleibt in der Beurteilung unsicher.

In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auf lokale Faktoren hingewiesen, die die Abwehr beeinflussen. Es wird beispielsweise diskutiert, daß zur sekretorischen Immunantwort nicht nur ein genügend hoher Titer vorliegen muß, sondern auch ein vollständiges 11-S-IgA mit secretory-piece notwendig ist (Rasche, 1976; Medici & Bürgi, 1970). Hier wird vermutet, daß ein Mangel des secretory-piece vorliegt und die Abwehr herabsetzt. Diese Vermutung kann durch die vorliegende Arbeit weder bestätigt noch abgelehnt werden, weil allein auf spezifisch bindende 7-S-IgA-Antikörper untersucht worden ist.

E. LITERATURVERZEICHNIS

- BAKER, J.,
HONG, R.,
DICK, Ch. Asthma, IgA deficiency and respiratory infections
The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 58: 713 - 721 (1976)
- BARTLETT, J.G.,
FINEGOLD, S.M. Bacteriology of expectorated sputum with quantitative culture and wash-technique compared to transtracheal aspirates
American Review of Respiratory Diseases, 117: 1019 - 1027 (1978)
- BURNS, M.W. Precipitins to pneumococcal C-substance polysaccharide in the serum of patients with chronic bronchial disorders
Lancet, 1: 223 - 225 (1968 a)
- BURNS, M.W. Precipitins to Klebsiella and other enterobacteria in the serum of patients with chronic respiratory disorders
Lancet, 1: 383 - 385 (1968 b)
- BURNS, M.W. The pattern of infection in bronchial diseases in Australia
Medical Journal of Australia, 2: 697 - 701 (1972)
- BURNS, M.W.,
MAY, J.R. Haemophilus influenzae precipitins in the serum of patients with chronic bronchial disorders
Lancet, 1: 354 - 358 (1967)

- CLARKE, C.W. Precipitating antibody in sputum
in chronic respiratory disease
Postgraduate Medical Journal, 51:
147 - 150 (1975)
- CLARKE, C.W. Aspects of serum and sputum anti-
body in chronic airways' obstruction
Thorax, 31: 702 - 705 (1976)
- DAVIES, J.L.,
LAUGHTON, C.R.,
MAY, J.R. An improved test for Haemophilus
influenzae precipitins in the serum
of patients with chronic respira-
tory disease
Journal of Clinical Pathology, 27:
265 - 268 (1974)
- DEUSCHL, H.,
JOHANSSON, S.G.O. Immunoglobulins in tracheo-bronchial
secretion in special reference to
IgE
Clinical and Experimental Immunology,
16: 401 - 412 (1974)
- DFG Forschungsbericht chronische Bronchi-
tis und Staubbelastung am Arbeits -
platz
Herausgeber H.Valentin et al. im
Auftrag der Deutschen Forschungs-
gemeinschaft, Bonn-Bad-Godesberg
(1975)
- ELLIS, D.A.,
ANDERSON, I.M.,
STEWART, S.M.,
CALDER, J.,
CROFTON, J.W. Exacerbations of chronic bronchitis:
Exogenous or endogenous infection?
British Journal of Diseases of the
Chest, 72: 115 - 121 (1978)

- FALK, G.A.,
OKINAKA, A.J.,
SISKIND, G.W.
Immunoglobulins in the bronchial washings of patients with chronic obstructive pulmonary disease
American Review of Respiratory Diseases, 105: 14 - 21 (1972)
- GRANFORS, K.,
VILJANEN, M .K.,
AHVOHNEN, P.,
TOIVANEN, P.
Measurement of IgM and IgG anti - bodies to Yersinia by Solid-Phase-Radioimmunoassay
The Journal of Infectious Diseases, 138: 232 - 236 (1978)
- GROSS, P.A.,
BARRY, D.W.,
D'ESOPPO, N.
Influenza immunization in chronic bronchitis: Local and systemic immune response
American Review of Respiratory Diseases, 114: 305 - 313 (1976)
- GUMP, D.W.,
CHRISTMAS, W.A.,
FORSYTH, B.R.,
PHILLIPS, C.A.,
STOUCH, W.H.
Serum and secretory antibodies in patients with chronic bronchitis
Archives of Internal Medicine, 132: 847 - 851 (1973)
- HAAS, H.,
MORRIS, J.F.,
SAMSON, S.,
KILBOURN, J.P.,
KIM, P.J.
Bacterial flora of the respiratory tract in chronic bronchitis: Comparison of transtracheal, fiber-bronchoscopic, and oropharyngeal sampling methods
American Review of Respiratory Diseases, 116: 41 - 47 (1977)
- HOLDAWAY, M.D.,
TURK, D.C.
Capsulated Haemophilus influenzae and respiratory-tract-disease
Lancet, 1: 358 - 360 (1967)

- KOROL, O.I.,
POKHODZEI, I.V.,
KOROVINA, O.V.,
SOBOLEVA, I.G.
Experience in active immunization
of patients with chronic bronchitis
with Staphylococcal vaccine
Sowetskaja Medizina, 5: 99 - 103 (1978)
- *
LIM, D.T.,
FREEL, B.J.,
GHANI, M.
Isolated IgA deficiency associated
with upper airway obstruction, sleep
dysrhythmia and failure to thrive -
case report
Annals of Allergy, 41: 299 - 302 (1978)
- MAY, J.R.
The flora of the respiratory tract
in chronic bronchitis
Postgraduate Medical Journal, 51:
144 - 146 (1975)
- MEDICAL RESEARCH
COUNCIL COMMITTEE
ON THE AETIOLOGY
OF CHRONIC BRON-
CHITIS
Definition and classification of
chronic bronchitis
Lancet, 1: 775 - 779 (1965)
- MEDICI, T.C.,
BUERGI, H,
The role of immunoglobulin A in
endogenous bronchial defense
mechanisms in chronic bronchitis
American Review of Respiratory Di-
seases, 103: 784 - 791 (1971)
- NICHOLLS, A.C.,
PEASE , P.E.,
GREEN , I.D.
Agglutinin response to bacterial
infection in acute exacerbations
of chronic bronchitis
Journal of Clinical Pathology, 28:
279 - 283 (1975)

- SHORE, S.L.,
POTTER, C.W.,
STUART-HARRIS, C.H. Antibody response to inactivated
influenza vaccine given by different
routes in patients with chronic
bronchopulmonary disease
Thorax, 28: 721 - 728 (1973)
- SIEBER, A., Plasmaproteinbestimmung durch
Lasernephelometrie: Laborpraxis
Laborblätter, 27: 109 - 118 (1977)
- SIEBER, A.,
GROSS, J. Proteinbestimmung durch Laser-
Nephelometrie
Laborblätter, 26, 117 - 122 (1976)
- SMITH, C.B.,
GOLDEN, C.A.,
KANNER, R.E.,
RENZETTI, A.D. Haemophilus influenzae and Haemo -
philus parainfluenzae in chronic
obstructive pulmonary disease
Lancet, 1: 1253 - 1255 (1976)
- SZABO, S.,
RASCHE, B.,
MODY , E. Untersuchung über die serologische
Aktivität der Immunglobuline des
Bronchialschleimes bei chronisch
obstruktiven Atemwegserkrankungen
Pneumonologie, 149: 1 - 29 (1973)
- * Ergänzung:
- LEES, A.W.,
MCNAUGHT, W. Bacteria of lower respiratory tract
secretions, sputum, upper-respiratory-
tract secretions in 'non' and chronic
bronchitics
Lancet, 2: 1112 - 1115 (1959)

Dankwort

An dieser Stelle sei Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch für die konsequente und geduldige Anleitung auf den Gebieten der Mikrobiologie und Immunologie, die zum Gedeihen meiner Arbeit führten, gedankt.

Herrn Prof. Dr. W.T. Ulmer möchte ich für die Beratung bezüglich der Planung dieser Arbeit und das Einbringen seiner Erfahrung auf dem Gebiet der chronischen Bronchitis danken.

Ein Dank gilt auch Herrn Priv. Doz. Dr. F. Falkenberg für die Anregung des Solid-Phase-Bindungstests.

Hier möchte ich auch an das kollegiale Entgegenkommen von seiten der "Labormannschaft" dankbar erinnern.

Lebenslauf

Ich, Eckard Kottmann, wurde am 10. April 1955 als erstes Kind der Eheleute Heinrich und Anne Kottmann, geb. Sommer, in Natbergen, jetzt Bissendorf, Kreis Osnabrück geboren.

Ab Ostern 1962 besuchte ich die St. Antonius Grundschule in Osnabrück-Voxtrup.

Ostern 1966 wechselte ich zum Graf-Stauffenberg-Gymnasium in Osnabrück über.

Im Mai 1974 erhielt ich das Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums.

Zum Wintersemester 1974/75 konnte ich das Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum aufnehmen.

Die ärztliche Vorprüfung legte ich im August 1976 ab und setzte das Studium mit dem klinischen Teil am Klinikum der GH Essen/Universität fort.

Der 1. ärztlichen Prüfung stellte ich mich im August 1977; die 2. ärztliche Prüfung folgte im März 1980.

Meine Ausbildung im Rahmen des Praktischen Jahres fand in der Augusta-Krankenanstalt Bochum statt.

Im April 1981 habe ich die 3. ärztliche Prüfung bestanden.

Bissendorf, im Mai 1981

